

T 细胞与 K562 细胞共培养的 AFM 观察*

金花^{1**} 马淑媛^{1,2} 陈家楠¹ 黄训¹ 赵宏霞^{1,3} 邢晓波¹ 蔡继业^{1***}

(1. 暨南大学化学系 广州 510632)

(2. 暨南大学第一附属医院 广州 510632)

(3. 广东工业大学轻工化工学院 广州 510090)

摘要 人类机体的免疫系统很难彻底清除肿瘤细胞,了解 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的整个过程的机理,将为提高免疫系统杀灭肿瘤的效率提供知识基础。本文采用原子力显微镜与倒置显微镜在细胞层面上观察 T 淋巴细胞进攻杀伤人慢性粒细胞性白血病细胞株—K562 细胞的过程,并对 T 细胞与 K562 细胞共培养前后的表面形貌和生物机械性质进行表征。结果显示,与培养前相比,共培养后 2 种细胞数目之和减少,2 种细胞的表面形貌和机械力学性质均出现很大差异,表现为:K562 细胞,平均粗糙度 (Ra) 降低,细胞平均高度 (Mh) 降低,细胞表面出现 5~8 μm 的孔洞,有的细胞甚至完全破裂溶解。多个 T 细胞的统计分析结果显示,共培养前, T 细胞为静息状态,而共培养后 Ra 和 Mh 都显著增加。该方法为研究免疫系统与肿瘤相互作用的机制提供重要的切入点。

关键词 T 淋巴细胞 K562 细胞 原子力显微镜

引 言

研究已知细胞可以经过程序性死亡的过程^[1],如凋亡 (apoptosis)。近年来研究人员发现细胞的一种非程序性死亡过程,即区别于细胞程序性凋亡,一种细胞侵入另一种细胞而导致后者死亡的过程^[2],并命名为 entosis,即“Within”的希腊文。这种细胞进入其它细胞的作用 (cell in cell structure),即活细胞“钻入”另一种细胞,并且可以在其中活动,甚至可以钻出该细胞。人体内淋巴细胞抗击癌变的过程就是典型的现象,淋巴细胞在与其他细胞接触过程中会进入后者胞浆中。1864 年, Eberth 发现淋巴细胞钻入肠上皮细胞。1956 年 Humble^[3] 等描述淋巴细胞侵入其他细胞并在其胞浆中活动的现象。王小宁^[4] 等也系统地描述免疫细胞进出肿瘤细胞的现象,而且发现进入肿瘤细胞的淋巴细胞不但可再出来,而且可从内部杀伤肿瘤细胞。现已知淋巴细胞可伸入巨噬细胞、人或小鼠肠柱状上皮细胞、纤维母细胞、肝细胞、肌细胞等。

原子力显微镜作为一种超高分辨率的形貌表征仪器,由于其样品制备简单,可在空气和液体中成像的特点,在生物学研究领域得到广泛应用。本文用原子力显微镜和倒置荧光显微镜观察人 T 淋巴细胞与 K562 肿瘤细胞的共培养过程中,2 种细胞表面

形貌特征变化,从细胞层面上为揭示 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤机理和过程提供重要的切入点和依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养液、Ficoll 分离液、胎牛血清 (均购自 GibcoBRL 公司),其余试剂或溶液均为分析纯。倒置荧光显微镜 (Inverted Microscope), Nikon TU-2000。原子力显微镜 (AFM), AutoProbe CP Research, 美国 Thermomicroscope 公司。

1.2 K562 细胞的复苏与培养

液氮中冻存的 K562 细胞复苏,以 2×10^6 /mL 接种于培养瓶内,培养液为含 12% 新生牛血清的 RPMI 1640,于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养,2~3 天换液一次。

1.3 人外周血 T 淋巴细胞 (T Lymphocyte Cell, 简称 TC) 的分离

抽取健康志愿者外周静脉血,肝素抗凝,等量 RPMI 1640 稀释,用 Ficoll 分离液进行密度梯度离心分离单个核细胞,接着以 2000 r/min 的转速离心 5 min 以去除细胞层内的血小板,之后用 RPMI 1640 洗 2~3 次后加入完全培养基,在塑料培养皿上培养吸附 3h 后去除单核-巨噬细胞后为淋巴细胞。然后采用尼龙棉柱法分离获得 T 细胞。台盼

*国家自然科学基金资助课题 (60578025, 30540420311)

**作者简介:金花 (1981-),女,山东泰安人,暨南大学,2006 级硕士,主要从事生物纳米技术方向的研究。E-mail: jinhua0413@163.com

***通讯作者:蔡继业 (1944-),男,上海人,教授,博士生导师。Tel/Fax: 020-85223569, E-mail: jycj@jnu.edu.cn

兰染色证明活细胞在 98% 以上。用完全培养基调整细胞浓度在 2.0×10^6 。实验分组：分别培养的 TL 和 K562 细胞组, TL 与 K562 细胞共培养组 (TL 与 K562 细胞数目比例为 1 : 1)。

1.4 AFM 成像及力曲线的测量

取各组细胞, 滴在新剥离的云母片上, 1.5% 的戊二醛固定 5 min。超纯水漂洗, 空气中风干。将制备好的样品固定在 AFM 的载物台上进行扫描观察, 试验采用 $100 \mu\text{m}$ 扫描器, UL20B 硅探针, 力常数为 2.8 N/m , 在接触模式 (tapping mode) 下扫描, 所得图像均以 AFM 自带软件 (Proscan Image Processing Software Version 2.1) 进行平滑处理以消除慢扫描方向上的低频噪音。数据的分析与统计均基于 AFM 自带软件, 如细胞表面平均粗糙度 (Ra)、细胞的体积、表面积等。力曲线的统计分析采用 SPSS 13.0 软件。

2 结果与分析

2.1 倒置显微镜下观察淋巴细胞与 K562 细胞相互作用的过程

对数生长期的 K562 细胞 0.5 mL (细胞数为 1.0×10^6 个) 与等体积 TC (细胞数为 1.0×10^6 个) 混合于培养皿内, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱共培养 12 h、24 h、48 h 后, 采用台盼兰染色计数细胞的数目显示, 随着共培养时间的增长, 2 种细胞数目之和减少 (见图 1)。

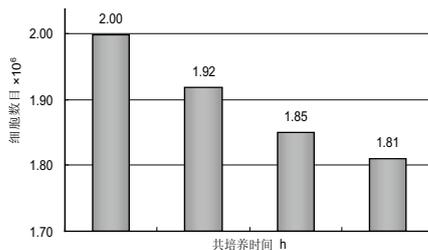


图 1 随着共培养时间的增长, 细胞数目的变化

同时置于倒置显微镜下观察细胞形态变化。刚开始共培养时, 两类细胞均呈现强折光性, 圆润饱满, 细胞形态良好 (见图 2A)。共培养 24 h 后, 可以看到 TL 先是粘着在 K562 细胞膜然后伸入其胞浆内 (见图 2B), 被 TL 进入的 K562 胞体上出现发亮的隆起物, 绝大多数 K562 细胞出现皱缩、凹陷, 少数甚至完全破裂 (见图 2C 箭头所示), TL 的折光性也有所下降, 多数细胞变的扁平, 细胞膜被破坏。

可看出, 图 2A 中 K562 细胞与 TL 都饱满圆润, 有较强的折光性。图 2B 中可以看到一个或多个

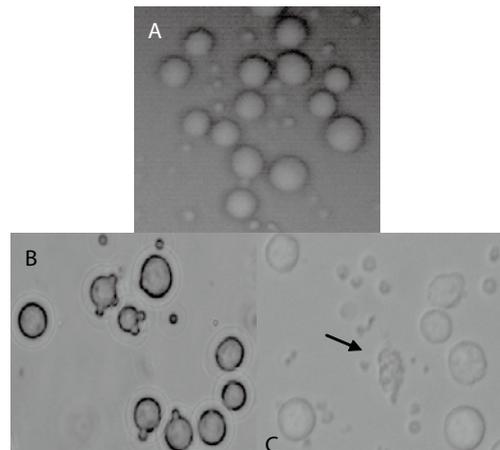


图 2 倒置显微镜下 K562 细胞与 TL 分别共培养 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C) 的细胞的形貌变化 TL 贴附在或钻入 K562 细胞。图 2C 中看到 2 种细胞的形态总体上出现损伤, 细胞形状变的不规则, 有些 K562 细胞完全破裂 (见图 2C 中箭头所示)。

2.2 AFM 对共培养前后 K562 细胞与 TL 形貌学和细胞表面纳米机械性质的表征

AFM 成像显示, 单独培养 K562 细胞, 呈现圆润饱满的球形, 周围有伸展的伪足 (见图 3A)。超微结构图可以看到细胞膜呈现均匀细致的鳞片状排列 (见图 3B), 直径约为 $9\sim 11 \mu\text{m}$, 高度约 $4.5\sim 5.8 \mu\text{m}$, 细胞膜上颗粒粒径在 1500 nm 左右 (见图 3C)。而与 TL 共培养 48 h 后的 K562 细胞明显损伤, 细胞膜出现裂痕和塌陷, 局部变得光滑, 细胞表面平均粗糙度下降, 伪足消失, 细胞表面颗粒降为 400 nm 左右 (见图 3D, E, F)。推测这可能是 K562 细胞膜破裂, 微绒毛被破坏, 同时膜表面的一些受体蛋白损伤所致。随着共培养时间的延长, 凹陷加深变宽形成宽 $2\sim 5 \mu\text{m}$ 左右的空洞, 内容物外泄, 高度下降到 $2.5\sim 3.8 \mu\text{m}$, 有的细胞甚至完全碎裂 (见图 2C)。而相对单独培养的 TL, 共培养后的 TL 也出现细胞表面粗糙度下降, 高度变低等现象。

对 TL 攻击 K562 细胞的过程的 AFM 扫描 (见图 3D) 可以看到 K562 细胞膜上有一个宽约 $5 \mu\text{m}$ 的空洞 (见图 3E)。由此可以推测, TL 进攻 K562 的过程是 TL 先通过其表面的一些特异性识别蛋白识别并粘着在 K562 靶细胞膜上, 然后在靶细胞膜上挖一个洞, 接着进入其胞浆内将细胞破坏裂解。少数 TL 甚至可以再从靶细胞内出来, 多数情况是二者“同归于尽”^[4]。

3 讨论

T 淋巴细胞在免疫系统中发挥着重要作用, 但一直没能从细胞层面观察到被激活的 T 淋巴细胞

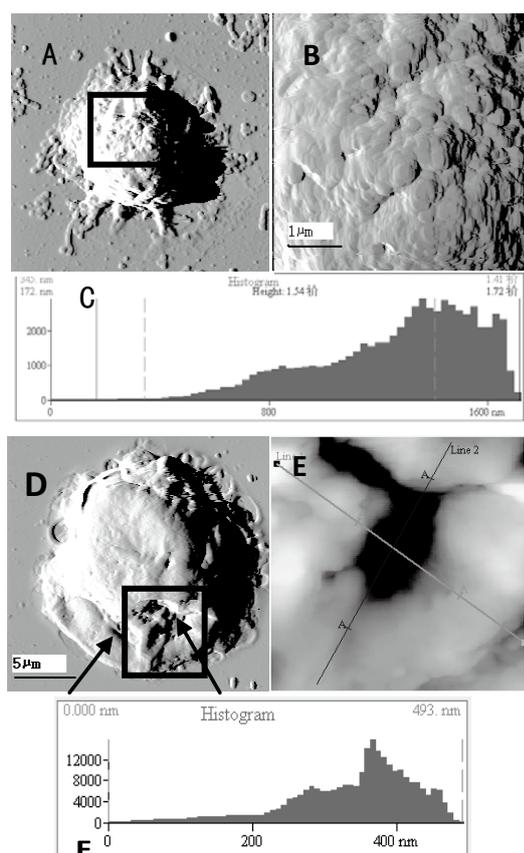


图3 与TL共培养前(A)和共培养后(D) K562细胞表面形貌变化的AFM图像

(B,E)分别为A, D中方框部分的放大,(C,F)分别为B, E中细胞表面颗粒分布图。共培养后,K562细胞表面出现若干4~6 μm的孔洞(图E)。细胞表面颗粒由1500nm左右,下降为400nm。扫描范围:(A,D) 20×20 μm; (B,E) 5×5 μm。

攻击的过程。Alexandre Boissonnas^[5]等利用双光子显微镜拍摄下T淋巴细胞识别致病细胞、包围并攻击致病细胞的整个过程。他们的研究还进一步证明,对肿瘤抗原的识别决定T淋巴细胞的行为。T淋巴细胞表面携带的特异性的膜受体可与病理细胞上的抗原形成互补,进而对其识别、清除。抗原可经过递呈而激活T淋巴细胞,激活的T淋巴细

胞可特异地识别感染因子及肿瘤细胞,并释放出特殊的酶来杀死致病细胞。本文采用倒置显微镜和AFM对共培养不同时间段的TL细胞和K562细胞的分析显示,共培养后的T细胞,细胞表面平均粗糙度和细胞高度明显增大,而K562细胞表面则出现多个空洞,有的甚至完全破裂溶解。这是由于TL进攻K562肿瘤细胞的过程中,在肿瘤细胞的刺激下发生活化,从而释放出多种介质和因子如穿孔素等。当TL与瘤细胞相结合时,TL即把含有穿孔素的颗粒从细胞中排出,穿孔素即从颗粒中释放出来,多个穿孔素分子在瘤细胞膜聚集,从而将瘤细胞膜穿出很多孔洞,最后甚至将细胞溶解^[6]。

人类机体的免疫系统有时很难将肿瘤有效地清除。因此,了解T淋巴细胞整个杀伤过程的机理,对于提高免疫系统杀灭肿瘤的效率,推广抗肿瘤免疫治疗在临床的应用具有很大的推动作用。

参考文献

- 1 Michael O, Joan SB. The cell biology of cell-in-cell structures, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008,9(10): 796~809
- 2 Overholtzer M, Mailloux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 2007, 131(5): 966~979
- 3 Humble JG, Jayne WH, Pulvertaft RJ. Biological interaction between lymphocytes and other cells. *Br. J. Haemat.* 1956, 2(3): 283~294
- 4 Wang XN, Li WJ. Mechanisms of Natural Killer Cell-mediated Tumor Cell Cytolysis at a Single Cell Level, *J Medical Colleges of PLA*, 1987, 2(2): 107~117
- 5 Alexandre B, Luc F, Ingrid SZ, etc. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med*, 2007, 204(2): 345~356
- 6 Berke G, Rosen D, Ronen D. Mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis: functional cytolytic T cells lacking perforin and granzymes. *Immunology*, 1993,78 : 105~11

Observation of the process of coculturing T lymphocyte and K562 cells with AFM

Jin Hua¹ Ma Shuyuan^{1,2} Chen Jianan¹ Huang Xun¹ Zhao Hongxia¹ Xing Xiaobo¹ Cai Jiye¹

(1. Chemistry Department, Jinan University, Guangzhou 510632)

(2. College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Human immune system is sometimes hard to remove tumor effectively. Therefore, understanding of the process and mechanism that T lymphocyte cells destroy tumor cells is very important for developing anti-tumor immunotherapies. In this paper, the inverted microscope was used to observe the process that T lymphocyte cells (TL) cocultured with K562 cells. And also, the atomic force microscope was used to detect the changes in cell morphology properties before and after two kinds of cells cocultured. The results indicated that TL could burrow into K562 cells and then killed the host cells, but the fate of most of the TL were changed as well. This special phenomenon provided an important evidence of interactive mechanisms between immune system and tumor cells at single cell level.

Key words T lymphocyte cell K562 cell Atomic force microscope(AFM)